研究用試薬

YK280 Human s-IgA (Saliva) ELISA

取　扱　説　明　書

FOR　RESEARCH　LABORATORY　USE　ONLY

株式会社　　矢内原研究所

〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770　TEL: 0544-22-2771

Website: www.yanaihara.co.jp　E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目　　次

Ⅰ．はじめに　**2**

Ⅱ．特　　徴　**3**

Ⅲ．キットの構成　**4**

Ⅳ．操作法　**5～6**

Ⅴ．操作上の注意　**7**

Ⅵ．基本性能　**8～10**

Ⅶ．貯蔵法および有効期間　**10～11**

Ⅷ．文献　**11**

YK280 Human s-IgA (Saliva) ELISA キット

Ⅰ．はじめに

分泌型 IgA（Secretory IgA, s-IgA）は免疫グロブリンの一種で、外分泌液中に最も豊富に含まれます。また、粘膜免疫の主役であり、消化管や呼吸器における免疫機構の最前線として機能しています。s-IgA は、IgA 産生形質細胞において J 鎖と結合し 2 量体として分泌され、その後、粘膜上皮細胞の基底膜側に発現している分泌成分（Secretory component, SC）と結合して分泌されます。

唾液は、採取が容易で非侵襲的に採取が可能であることから、唾液中の s-IgA 濃度は、種々のストレス、心理学的研究において有用な生体指標として用いられています[1、2、3)]。

本キットは、唾液中に存在する s-IgA を特異的かつ簡便に測定できます。

YK280 Human s-IgA (Saliva) ELISA キット

- ▼ ヒト唾液中分泌型 IgA (s-IgA) 測定用です。
- ▼ 0.082~20 μg/mL の範囲で測定できます。
- ▼ 41 検体を duplicate で測定できます。
- ▼ 測定は約 2.5 時間で終了します。
- ▼ 唾液の測定ができます。
- ▼ 検体量は 5 μL です。緩衝液で 80 倍希釈します。
- ▼ プレートは 1 列（8 ウエル）毎に取り外しできますのでキットの分割使用が可能です。

内容

1) 測定プレート
2) 標準品
3) 標識特異抗体液
4) 酵素基質液
5) 酵素反応停止液
6) 濃縮緩衝液（2x）
7) 濃縮洗浄液
8) プレート密閉用シール

保存と安定性　2～8℃で保存してください。
製造日より 6 ヶ月間は安定です。

Ⅱ．特　　徴

本キットはヒトの唾液中に含まれる s-IgA 濃度を測定するためのものです。本キットによる s-IgA の測定は簡便でしかも特異性、定量性に優れ、共存する他の生理活性物質や体液成分の影響を受けにくいなど多くの利点を備えています。

＜特異性＞

本キットはヒト s-IgA に特異的であり、ヒト血清型 IgA、IgG、IgM および IgE に対する交差反応性をほとんど認めません。

＜測定原理＞

本キットによる測定はサンドイッチ法に基づいて行います。測定プレート（96 ウエル）の各ウエルにはマウス抗ヒト s-IgA 特異的モノクローナル抗体が固定化されています。この各ウエルに標準液またはあらかじめ希釈した検体を入れ、抗原抗体複合体を形成させ、さらに HRP 標識化ヤギ抗ヒト IgA (α chain) 抗体と反応させ、サンドイッチ複合体を形成させます。最後にこの複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中の s-IgA を測定することができます。

Ⅲ. キットの構成

試薬・器具	形状	規格		内容物
1.測定プレート		96 ウエル1 枚プレート		マウス抗ヒト s-IgA モノクローナル抗体
2.標準品	凍結乾燥品	10 μg/vial	1 本	ヒト s-IgA（精製品）
3.標識特異抗体液	液状	12 mL	1 本	HRP 標識ヤギ抗ヒト IgA（α chain）抗体
4.酵素基質液	液状	12 mL	1 本	3,3’,5,5’-テトラメチルベンジジン（TMB）
5.酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸溶液
6.濃縮緩衝液（2x）	液状	25 mL	1 本	反応促進試薬を含む緩衝液
7.濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本	1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
8.プレート密閉用シール			3 枚	

Ⅳ. 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。
注意 : キットに含まれるすべての試薬は、測定開始約 2 時間前に室温に戻してください。試薬全てが十分に室温に戻っていることを確認してから測定を始めてください。

＜使用器具および装置＞

1. マイクロピペットおよびチップ（5 µL～1 mL）; 8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットの使用を薦めます
2. マイクロプレート用吸光度計（測定波長 450 nm で吸光度 3.0 まで測定できる装置）
3. マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
4. 標準液、希釈検体の調製に使用するガラスもしくはポリプロピレン製試験管
5. マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプの使用を薦めます
6. メスシリンダー（1000 mL）
7. 蒸留水または脱イオン水

＜唾液の採取方法＞

唾液の採取には、サリソフト（ザルスタット株式会社　商品コード 51.1534.901J）もしくはオーラルスワブ＋保存用チューブ（フナコシ株式会社　商品コード 5001.02＋5001.05）を使用してください。唾液の採取は、それぞれの取扱説明書に従って行い、採取した唾液検体は遠心分離（3000rpm・15 分間）を行った後、ただちに-30℃以下で凍結保存してください。

＜試薬の調製＞

1. 緩衝液の調製法：濃縮緩衝液（2x）適量を蒸留水で２倍に希釈して使用する。
2. 標準液の調製法：標準品の容器に緩衝液 0.5 mL を加え、約 10 分間静置して溶解する。その後、内容物を十分に撹拌し、20 µg/mL (0.5mL) の標準液とする。この標準液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 6.67 µg/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、2.22, 0.74, 0.25, 0.082 µg/mL の各標準液を調製する。 0 µg/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
   ＜測定範囲＞有効測定範囲　0.082 µg/mL～20 µg/mL
3. 洗浄液の調製法：濃縮洗浄液 50 mL（全量）を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。希釈した洗浄液を冷蔵保存した場合は、完全に室温に戻してから使用する。

4. その他の試薬はそのまま＜測定操作＞に従って使用する。

＜希釈検体の調製＞

凍結保存していた唾液検体は、室温で融解後よく撹拌してください。唾液検体を＜試薬の調製＞ 1. 緩衝液の調製法で調製した緩衝液で 80 倍希釈します。

1. 唾液検体数の試験管を準備し、各試験管に緩衝液を 395 μL ずつ入れる。
2. 各唾液検体を 5 μL ずつ添加し、よく撹拌する。

＜測定操作＞

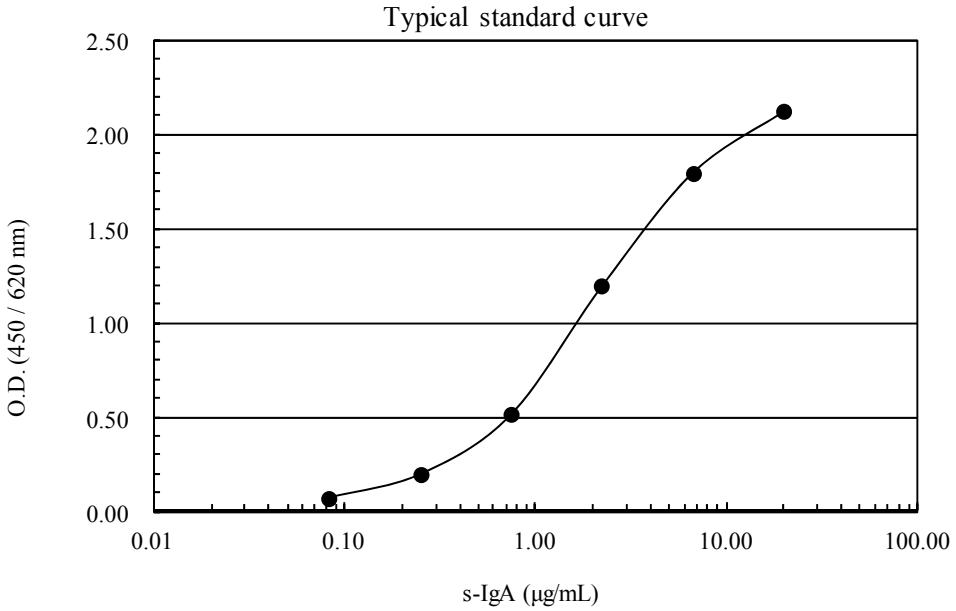
1. キット内容を室温（20～30℃）に戻す。
   緩衝液、標準液、洗浄液および希釈検体を上記の方法に従って調製する。
2. 測定プレートの各ウエルに、洗浄液 350 μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行う。
3. 各ウエルに緩衝液 100 μL を入れ、ついで標準液 (0, 0.082, 0.25, 0.74, 2.22, 6.67, 20 μg/mL)または希釈検体 50 μL を加える。
4. 測定プレートをプレートミキサーで 1 分間撹拌（500rpm）した後、プレート密閉用シールでシールし、室温で 1 時間振とうする（約 100 rpm)。
5. 各ウエル中の液を除き、2 . と同様の洗浄操作を合計 6 回行う。
6. 各ウエルに標識特異抗体液 100 μL を加える。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 1 時間振とうする（約 100 rpm)。
8. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 6 回行う。
9. 各ウエルに酵素基質液 100 μL を加え、遮光の状態で室温で静置し、30 分間反応させる。
10. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μL を加える。
11. マイクロプレート用吸光度計にて 450 nm/620 nm の吸光度を測定する。
12. 市販のソフトウェアを用いて、5（or 4）－Parameter の回帰式を使用し、標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、希釈検体の s-IgA 濃度を求める。求めた濃度を 80 倍し、元の唾液検体中の s-IgA 濃度を算出する。片対数方眼紙を用いる場合は、横軸（Log 側）に標準液の濃度を、縦軸（Linear 側）に標準液各濃度の吸光度をプロットして標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、s-IgA の濃度を読み取る。

Ⅴ． 操作上の注意

1. 唾液検体は－30℃以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品は調製後、直ちに使用してください。なお、キットを分割使用する場合、調製後の標準品は適宜小分けして、－30℃以下で凍結保存してください。
3. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
4. 各ウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また検体をウエルに注入する場合は、検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
5. 希釈検体が 20 μg/mL を超える高値検体の場合は、80 倍希釈検体をさらに緩衝液にて希釈して測定してください。
6. 室温での反応には必ずマイクロプレート用振とう機を用い、測定プレートを振とうしてください（呈色反応の場合を除く）。なお、振とうはプレート密閉用シールに反応液がはねないようゆっくりと行ってください（約 100 rpm）。
7. 測定はすべて２重測定で行ってください。
8. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
9. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。
10. 各試薬の保存中もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意してください。
11. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせて使用しないでください。
12. 酵素基質液は遮光しながら室温に戻し、使用してください。
13. 一部の試薬には、ヒト由来生物学的材料を使用していますので取り扱いに注意してください。

VI. 基本性能

＜標準曲線の一例＞



＜添加回収試験＞

＜ヒト唾液 A＞

Added s-IgA (μg/mL)	Observed (μg/mL)	Expected (μg/mL)	Recovery (%)
0	64.8		
40	108.8	104.8	103.8
160	220.8	224.8	98.2
400	404.8	464.8	87.1

＜ヒト唾液 B＞

Added s-IgA (μg/mL)	Observed (μg/mL)	Expected (μg/mL)	Recovery (%)
0	46.4		
40	96.0	86.4	111.1
160	196.0	206.4	95.0
400	432.0	446.4	96.8

＜ヒト唾液 C＞

Added s-IgA (μg/mL)	Observed (μg/mL)	Expected (μg/mL)	Recovery (%)
0	120.8		
40	189.6	160.8	117.9
160	274.4	280.8	97.7
400	476.0	520.8	91.4

＜ヒト唾液 **D**＞

Added s-IgA (μg/mL)	Observed (μg/mL)	Expected (μg/mL)	Recovery (%)
0	112.0		
40	157.6	152.0	103.7
160	244.8	272.0	90.0
400	441.6	512.0	86.3

＜ヒト唾液 **E**＞

Added s-IgA (μg/mL)	Observed (μg/mL)	Expected (μg/mL)	Recovery (%)
0	105.6		
40	152.0	145.6	104.4
160	250.4	265.6	94.3
400	600.8	505.6	118.8

＜希釈試験＞

＜ヒト唾液 **A**＞

Sample dilution	Observed (μg/mL)	Expected (μg/mL)	% of Expected (%)
X1	363.5	363.5	
X2	201.7	181.8	111.0
X4	107.7	90.9	118.5
X8	53.6	45.4	117.9

＜ヒト唾液　**B**＞

Sample dilution	Observed (μg/mL)	Expected (μg/mL)	% of Expected (%)
X1	237.4	237.4	
X2	123.9	118.7	104.4
X4	65.3	59.4	110.0
X8	32.5	29.7	109.4

＜ヒト唾液 **C**＞

Sample dilution	Observed (μg/mL)	Expected (μg/mL)	% of Expected (%)
X1	310.0	310.0	
X2	167.3	155.0	107.9
X4	89.5	77.5	115.5
X8	42.7	38.8	110.2

＜ヒト唾液 **D**＞

Sample dilution	Observed (μg/mL)	Expected (μg/mL)	% of Expected (%)
X1	293.3	293.3	
X2	145.3	146.7	99.1
X4	74.7	73.3	101.8
X8	38.3	36.7	104.4

＜ヒト唾液 E＞

Sample dilution	Observed (μg/mL)	Expected (μg/mL)	% of Expected (%)
X1	188.2	188.2	
X2	97.5	94.1	103.6
X4	47.4	47.0	100.7
X8	26.8	23.5	114.0

＜交差反応性＞

関連抗体タンパク質	交差反応性（%）
Serum IgG (Human)	<0.1
Serum IgA (Human)	0.3
Serum IgM (Human)	0.0
Serum IgE (Human)	0.0

＜再現性試験＞

同時再現性： CV(%) 2.9～5.8

日差再現性： CV(%) 3.5～11.2

＜測定範囲＞

0.082~ 20 μg/mL

＜他社キットとの相関関係＞

他社の唾液専用 EIA キット（S 社）で得られた測定値との相関関係は以下のようになります。

y=0.8539x + 31.222, r=0.946 (n=39)

Ⅶ. 貯蔵法および有効期間

＜貯法＞

遮光し、2～8℃にて保存してください。

＜有効期間＞

製造日より 6 ヶ月間（使用期限は外箱に表示）

＜包装＞

1キット96テスト分（標準曲線作成用を含む）

Ⅷ. 文　献

1. Evans, P., Bristow, M., Hucklebridge, F., Clow, A., and Pang, FY. (1994) Stress, arousal, cortisol and secretory immunoglobulin A in students undergoing assessment. Br. J. Clin. Psychol., 33, 575-576
2. Bristow, M. Hucklebridge, F., Clow, A., and Evans, P. (1997) Modulation of secretory immunoglobulin A in saliva in relation to an acute episode of stress and arousa. J. Psychophysiol., 11, 248-255
3. Fujiwara, S., Yogo, M. (2003) Measuring salivary immunoglobulin A for psychological studies of stress and emotion. Doshisha Psychological Review, 50, 57-81

＜お問合せ先＞

株式会社　矢内原研究所

〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉2480-1

FAX:0544-22-2770　TEL:0544-22-2771

www.yanaihara.co.jp　ask@yanaihara.co.jp

2015年8月25日作成